



Microbiota ruminal: cuantificación, caracterización y aislamiento de potenciales organismos probióticos para prevenir la acidosis bovina.

Perelmuter, K.¹, Fraga, M.¹, Valencia, M.J.¹, Pérez, A.², Zunino, P.¹

¹ Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Av. Italia 3318. ² Departamento de Nutrición, Facultad de Veterinaria, Lasplacas 1550. Montevideo, Uruguay

Resumen

La acidosis bovina constituye, a nivel mundial, una de las más importantes afecciones del ganado lechero y de engorde. La biota ruminal se ve influenciada por esta afección y algunos de sus miembros pueden ser responsables del desencadenamiento de la misma. En este trabajo se planteó el análisis de la biota bacteriana y selección y caracterización de cepas con el potencial de prevenir la acidosis bovina.

Se realizaron recuentos en medios selectivos para bacterias utilizadoras de lactato y de celulosa como única fuente de carbono, así como en medio general para bacterias ruminales. A su vez se analizó la biota cultivable y no cultivable a través de la técnica molecular de FISH.

Las cepas aisladas fueron analizadas en cuanto a la producción de sustancias con actividad antimicrobiana contra patógenos gram positivos y gram negativos y en cuanto a su capacidad para utilizar lactato.

Se obtuvo una colección de aislamientos de la cual se destacan 8 cepas por inhibir tanto el crecimiento de *Escherichia coli* como el de *Streptococcus* sp. y además por su capacidad de utilizar lactato. Estas cepas serán utilizadas en futuros abordajes en modelos in vivo donde se evaluará su potencial para la modulación de la acidosis bovina.

Introducción y objetivos

La acidosis es provocada por la ingestión de carbohidratos fácilmente fermentables en cantidades mayores a las que normalmente puede tolerar el rumen. Esta situación provoca la acumulación de AGV, un concomitante descenso del pH ruminal (1) y cambios en la microbiota ruminal. Están asociados a este trastorno un aumento en la abundancia de *Streptococcus bovis* y otros microorganismos productores de ácido láctico así como una disminución de los microorganismos utilizadores de lactato (2).

El objetivo de este trabajo fue analizar la flora bacteriana ruminal de bovinos en condiciones de pastoreo y aislar y caracterizar potenciales probióticos para prevenir la acidosis bovina.

Materiales y Métodos

Animales y muestreo. Se utilizaron 2 vacas Holando canuladas en rumen en condiciones de pastoreo pertenecientes al Campo Experimental N°2, Facultad de Veterinaria. Se realizaron tres muestreos de contenido y fluido ruminal que fueron diluidos y transportados en condiciones de anaerobiosis en PBS reducido (3). Las muestras de contenido fueron procesadas en licuadora bajo corriente de CO₂ previo a la dilución.

Análisis de la biota bacteriana ruminal cultivable. Se sembraron viales por cuadruplicado en diferentes medios

según la técnica de "rolling tube". Para determinar número total de bacterias se utilizó medio PY modificado suplementado con fluido ruminal (4,5). Las bacterias consumidoras de lactato se cuantificaron utilizando el mismo medio, pero con lactato como única fuente de carbono, mientras que las bacterias consumidoras de celulosa se cuantificaron en PY con celulosa microcristalina como única fuente de carbono. En todos los casos se generó atmósfera anaerobia dentro de los viales por gaseado con CO₂ y por la utilización de Na₂S-cisteína como agente reductor.

Análisis molecular de la biota bacteriana ruminal. Para evaluar la comunidad bacteriana total (cultivable y no cultivable) se utilizó la técnica de *Fluorescence in situ hybridization* (FISH). Se diseñaron sondas de oligonucleótidos específicas para cuantificar *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus* spp., *Megaesphaera eldelsenii*, *Propionibacterium* spp. y *Selenomonas ruminantium*.

Caracterización e identificación de los aislamientos. Se evaluó la actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Streptococcus* sp. de los aislamientos utilizando una modificación de la técnica "spot on the lawn". La utilización de lactato como única fuente de C se evaluó en medios de crecimiento modificado para tales fines también en condiciones de anaerobiosis. Para la identificación se amplificó y secuenció el rADN 16S (6)

Resultados

Recuentos de microorganismos cultivables. En la figura 1 se muestran los recuentos bacterianos obtenidos.

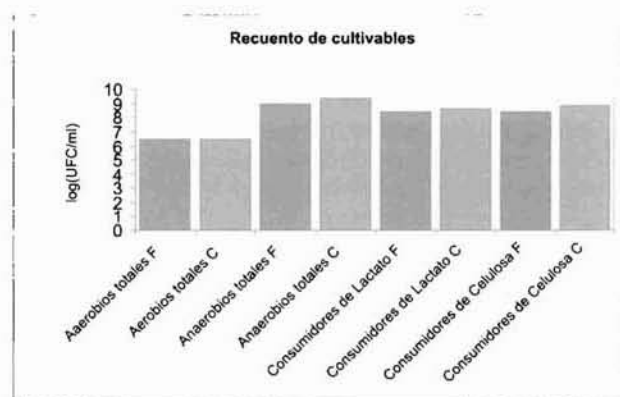


Figura 1: Recuentos de los diferentes grupos bacterianos de fluido (F) y contenido ruminal (C)

Abundancias relativas. Mediante la técnica de FISH se determinó la abundancia relativa con respecto a microorganismos totales (teñidos con DAPI).

Tabla 1: Abundancia relativa de microorganismos por técnica FISH en muestras de fluido ruminal.

Organismo	Abundancia relativa (% DAPI)
Ruminococcus albus	1.5
Ruminococcus flavefaciens	<0.1
Streptococcus spp.	<0.1
Propionibacterium spp.	0.6
Selenomonas ruminantium	1
Megasphaera elsdenii	1.2
Eubacteria	68

Caracterización e identificación de los aislamientos. Se obtuvo una colección de 58 aislamientos bacterianos los cuales fueron analizados en cuanto a su capacidad de producir sustancias antimicrobianas y de utilización del lactato. Se analizó la actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *Streptococcus* spp., tres de las cepas mostraron inhibición total del crecimiento de *E. coli* y 37 cepas mostraron inhibición parcial del crecimiento. Seis de las cepas analizadas mostraron inhibición total del crecimiento de *Streptococcus* spp., mientras que 12 cepas mostraron inhibición parcial del crecimiento. El 49 % de los aislamientos analizados mostraron la capacidad de crecimiento en medio con lactato como única fuente de carbono. Se han identificado cepas pertenecientes a los géneros y especies: *Selenomonas ruminantium*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Granulicatella* spp. y *Enterococcus* spp.

Discusión

Los recuentos se ubicaron dentro de lo esperado observando un mayor número de microorganismos en contenido ruminal. Esta muestra tiene representados a los microorganismos que estaban adheridos al material vegetal.

Este es el primer trabajo en que se utiliza con éxito la técnica de FISH para caracterizar la microbiota ruminal. Las sondas fueron diseñadas y probadas con éxito y los valores de abundancia de *R. albus* y *R. flavefaciens* se encuentran dentro de lo esperado según metodologías como librerías de genes (7). Es de interés notar que la población bacteriana hibridada representa el 68% del total de microorganismos. Ocho cepas presentaron las propiedades de crecimiento

en medio con lactato como única fuente de carbono y la capacidad de inhibir el crecimiento tanto de *E. coli* como de *Streptococcus* sp. Este hecho ubica a estas cepas como candidatas a ser utilizadas en aproximaciones in vivo para evaluar su potencial como probióticos para prevenir la acidosis en bovinos.

Summary

Bovine acidosis is one of the most important diseases affecting cattle. Ruminal microbiota is influenced by this disease and, in fact, some members of this community could act as a trigger. In this work the bacterial microbiota was assessed and also selection and characterization of strains with the potential to prevent acidosis was performed.

Selective media containing only lactate and only cellulose as sole sources of carbon were used in order to quantify these important ruminal groups of microorganisms. The whole microbiota (culturable and non-culturable) was assessed with the aid of FISH.

Isolated strains were characterized and antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Streptococcus* sp. and the ability to grow in media with lactate as a sole source of carbon were evaluated.

Eight strains were able to inhibit both pathogens and also to grow in lactate medium. These strains are promising candidates for their evaluation in *in vivo* trials in order to prevent bovine acidosis.

Referencias

- 1- Stock, R. y Britton, R. (1993) Acidosis in feedlot cattle. página A1 en Scientific Update on Rumensin/Tyland for the Professional Feedlot Consultant. Elanco Anim. Health, Indianapolis, IN.
- 2- Strobel, H.J., Russell, J.B. (1986) J Dairy Sci. 69:2941-7.
- 3- Macy, J.M, Snelen, J.E. *et al* (1972) Am. J. Clin. Nutr. 25:1318-1323.
- 4- Stahl, D.A., Flesher, B. *et al* (1988) App. Environ. Microbiol. 54:1079-1084.
- 5- Macy, J. M. Farrand J.R. *et al* (1982) App. Environ. Microbiol. 44:1428-1434.
- 6- Perelmuter, K., Fraga, M. Zunino, P (2008) J Appl Microbiol. On line published.
- 7- Sundset, M.A., Praesteng, K.E. *et al* (2007) Microb. Ecol. 54:424-38

Este trabajo fue financiado por el Proyecto PDT 78/07 y CSIC Iniciación a la Investigación 2006.